

# Receptorhatások összehasonlító funkcionális vizsgálata rekombináns fehérjéket expresszáló sejtvonalakon

Doktori értekezés tézisei

Kurko Dalma

Eötvös Loránd Tudományegyetem



Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Erdei Anna D.Sc., egyetemi tanár

Idegtudomány és Humánbiológia Doktori Program

Vezetője: Dr. Détári László D.Sc., egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Nagy József Ph.D., osztályvezető

Richter Gedeon NyRt.

Farmakológiai és Gyógyszerbiztonsági Kutatási Főosztály

Budapest

2015

## 1. Bevezetés

A humán genom egyik legnagyobb családját alkotó G-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR) a gyógyszerkutatás legnépszerűbb célpontjai közé tartoznak. Jelentőségüket jól jelzi, hogy a jelenleg alkalmazott gyógyszerek közel fele közvetve, vagy közvetlenül ezeken a receptorokon keresztül fejti ki hatását.

A metabotróp, 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptorok családjának egyik fontos képviselői az  $\alpha_2$ -adrenoreceptorok ( $\alpha_2$ -AR). Molekuláris biológiai és farmakológiai vizsgálatok három  $\alpha_2$ -AR altípus ( $\alpha_{2A}$ -AR,  $\alpha_{2B}$ -AR és  $\alpha_{2C}$ -AR) jelenlétét igazolták a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben. A működésüket befolyásoló vegyületeket széles körben alkalmazzák a gyógyászatban, főként a kardiovaszkuláris és a központi idegrendszert érintő kórképek terápiájában. Az egyes altípusok némiképp eltérő szöveti megoszlása és az általuk közvetített biológiai hatások különbözősége alapján úgy tűnik, hogy az altípus szelektív  $\alpha_2$ -AR ligandok legalább részben mentesek lehetnek a jelenlegi, érdemi altípus-szelektivitást nem mutató (gyógy)szerek mellékhatásaitól. Ennek jegyében az elmúlt 10 évben több mint 90 szabadalom született az  $\alpha_{2C}$ -AR altípus szelektív vegyületek vonatkozásában. A kiemelkedő erőfeszítések ellenére ezidáig csupán 10-100-szoros altípus szelektivitással rendelkező vegyületek sikerült azonosítani.

A közelmúlt kutatási eredményei arra is rávilágítottak, hogy az eddig kizárólag a különféle altípusoknak tulajdonított hatás-mellékhatás tulajdonságok pontosabb megértéséhez elengedhetetlen a receptorok jelátviteli útvonalainak részletes feltérképezése. A legtöbb GPCR esetében, a receptor ligandkötését követően, a G-fehérje közvetített jelátvitel mellett G-fehérje-független szignalizációs útvonalak is aktiválódnak, amelyek más-más élettani hatásokat közvetíthetnek. Az egymástól függetlenül aktiválódó jelpályák ún. jelátvitel-szelektív agonistákkal („biased agonists”) szelektíven befolyásolhatóak. A különböző jelátviteli útvonalak közötti funkcionális különbségek felismerése a szelektivitás egy új dimenzióját teremtette meg a gyógyszerkutatás számára. Ennek értelmében az agonisták nem csupán egy adott receptorra vagy receptor altípusra lehetnek szelektívek, hanem egy receptor különböző jelátviteli útvonalainak szelektív aktiválására, illetve gátlására is képesek lehetnek.

Napjaink gyógyszerkutatási gyakorlatában ezért már nem csupán a molekuláris célpont kiválasztása és validálása, hanem a hozzá kapcsolódó, fiziológiásan releváns jelpályák validálása is elsődleges fontosságúvá vált. A jelátviteli útvonalak részletes feltérképezése, a különböző szignalizációs útvonalak funkcionális különbségeinek megismerése

kulcsfontosságú egy adott betegség patomechanizmusának lehető legteljesebb megértéséhez, és ezáltal jobb hatásspektrumú gyógyszerek kifejlesztéséhez.

## 2. Célkitűzések

Rekombináns humán  $\alpha_2$ C-adrenoreceptorokat expresszáló heterológ sejttes modellrendszerek létrehozásával, amelyek egyaránt alkalmasak a gyógyszerkutatás korai szakaszában a célpont-specifikus új gyógyszerjelölt vegyületek kiválasztására, valamint a receptorok sokszínű szignalizációs útvonalainak farmakológiai jellemzésére, mód nyílhat új, a jelenleg rendelkezésre álló szereknél előnyösebb altípus- és funkcionális-szelektivitást mutató gyógyszerek kifejlesztésére.

Mindezek alapján célunk volt:

- az  $\alpha_2$ C-AR aktivációját kísérő különböző jelpályák farmakológiai tulajdonságainak vizsgálata
- ennek során:
  - az  $\alpha_2$ C-AR ligandok kötődésének meghatározása az [ $^3$ H]-UK14,304 receptorkötési tesztben
  - az  $\alpha_2$ C-AR aktiváció adenilát ciklázra kifejtett hatásának vizsgálata a citoplazmatikus cAMP-szint változásának detektálásával
  - egy olyan sejtvonal létrehozása, amely az  $\alpha_2$ C-AR és kiméra  $G_{\alpha_{i5}}$  fehérjék koexpressziójával lehetővé teszi a  $[Ca^{2+}]_i$  változásainak fluorometriával történő vizsgálatát
  - az  $\alpha_2$ C-AR és a  $\beta$ -arresztin-2 közötti molekuláris interakció vizsgálata
  - az  $\alpha_2$ C-AR internalizáció vizsgálata
- az  $\alpha_2$ C-AR agonisták funkcionális szelektivitásának kvantitatív elemzése a relatív aktivitás (RA) módszer alkalmazásával
- fragmens alapú szűréssel azonosított újszerű  $\alpha_2$ C-AR ligandok farmakológiai jellemzése a fenti módszerek segítségével

### 3. Alkalmazott anyagok és módszerek

#### 3.1. Rekombináns sejtvonalak

Az  $\alpha_2C$ -AR-t stabilan és konstitutívan kifejező CHO-K1 alapú sejtvonalat ( $\alpha_2C$ -C1 sejtek) 10% magzati borjú szérummal és antibiotikumok keverékkel kiegészített F-12 médiumban tenyésztettük.

A  $\alpha_2C$ -AR-t stabilan és konstitutívan kifejező humán oszteoszarkóma sejteket (U2OS sejtvonala) 10% PathHunter<sup>TM</sup> szérummal és antibiotikumok keverékkel kiegészített U2OS médiumban tenyésztettük.

A humán  $\alpha_2C$ -AR-t és  $G\alpha_{q15}$  kiméra fehérjét stabilan kifejező sejtvonalak létrehozása során a  $G\alpha_{q15}$  kiméra fehérjét és hemagglutinin epitópot (HA-tag) kódoló cDNS-t pCEP4 vektorba építve juttattuk be a sejtekbe. A transzfekcióhoz a 96-lyukú sejtenyésző lemezekbe szélesztett sejteket négy órán keresztül inkubáltuk lipofectint és pCEP-Gq15-HA vektort tartalmazó szérum-mentes F-12 médiumban. Négy óra múlva a transzfekciós médiumot szelekciós médiumra cseréltük, és a klónok felnevesztése során is ezt a tápfolyadékot használtuk. A klónok kiválasztása során a  $G\alpha_{q15}$  mRNS kimutatását RT-PCR módszerrel,  $G\alpha_{q15}$  fehérje expressziójának immuncitokémia kimutatását áramlási citometriával végeztük. Az eredmények alapján a farmakológiai vizsgálatokhoz a H7 sejtvonalat választottuk ki.

#### 3.2. [<sup>3</sup>H]-UK14,304 receptorkötési teszt

A [<sup>3</sup>H]-UK14,304 receptorkötési tesztet  $\alpha_2C$ -AR-t stabilan expresszáló CHO-K1 sejtekből származó membrán-készítményen végeztük. A telítődési görbét 0,1-15 nM [<sup>3</sup>H]-UK14,304 jelenlétében 30 perces szobahőmérsékletű inkubációt követően határoztuk meg. Ennek alapján a sejtekhez 2 nM koncentrációban adtuk a radioligandot és a növekvő koncentrációjú vizsgálandó, jelöletlen ligandot a hideg leszorításos kísérletek során (30 perc szobahőmérsékleten). A nonspecifikus kötődést 10  $\mu$ M fentolamin jelenlétében határoztuk meg. A reakciót gyors szűréssel választottuk szét, a radioaktivitást folyadék-szcintilláció módszerrel határoztuk meg (Topcount NXT szcintillációs plate counter).

#### 3.3. A citoplazmatikus cAMP mérése időkapuzott FRET (HTRF®) módszerrel

A HTRF® technológián alapuló cAMP Dynamic2 kit-tel történő mérésekhez kis-térfogatú 96-lyukú sejtenyésző lemezre ültetett  $\alpha_2C$ -C1 sejteket használtunk. A médium eltávolítása után az IBMX-et is tartalmazó mérőpufferben a sejtekhez adtuk a vizsgálni kívánt

vegyületeket, majd 1  $\mu\text{M}$  forskolinnal (FSK) történő 30 perces inkubációt követően a sejt aktivációt lízis pufferben hígított detekciós komponensek (cAMP-d2 és anti-cAMP-kriptát) hozzáadásával állítottuk le. 60 perces szobahőmérsékleten történő inkubáció követően a specifikus szignált a PHERAstar FS multi-mode plate olvasóval rögzítettük. A TR-FRET mértékét az akceptor fluoreszcencia (A665 nm) valamint a donor fluoreszcencia (A620 nm) aránya  $\times 10^4$  ráciometrikus hányadosként a 96-lyukú szövettenyésztő lemez minden bemélyedésében kiszámoltuk. A vizsgált agonisták által maximálisan kiváltható választ ( $E_{\text{max}}$ ) az ugyanazon a lemezen meghatározott maximális UK14,304 válasz százalékában adtuk meg.

### **3.4. A citoplazmatikus $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) mérése fluorometriás módszerrel**

A mérésekhez 96-lyukú vagy 384-lyukú (nagy áteresztőképességű szűrés (HTS) során) sejttenyésztő lemezre ültetett  $\alpha_{2C}$ -AR és  $G_{\alpha_{i5}}$  fehérjét koexpresszáló sejteket (H7 sejtvonal) használtunk. A sejteket fluo-4/AM vagy FLIPR Calcium 5 (HTS szűrés) fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny festékkel töltöttük fel. 25-60 perc inkubáció után a sejtekhez adtuk a vizsgálandó antagonistákat vagy kontroll puffer oldatokat, majd a fluoreszcenciát FlexStation II vagy FLIPR Tetra imaging plate reader (HTS szűrés) készülékek segítségével mértük (gerjesztés: 485 nm, emisszió: 525 nm). Az alap  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szinthez tartozó fluoreszcencia 10-20 másodpercig tartó monitorozása után a műszerek beépített 8-csatornás adagolójával vizsgálandó agonistát jutattunk sejtekre, majd a fluoreszcencia intenzitás változását további 40-50 másodpercen keresztül rögzítettük. Az eredményeket  $\Delta F/F$  arányként fejeztük ki, ahol  $\Delta F$  a maximális mért fluoreszcencia és a kiindulási átlagos fluoreszcencia különbségét,  $F$  pedig a kiindulási fluoreszcenciát jelenti. A vizsgált agonisták  $E_{\text{max}}$  válaszát a maximális UK14,304 válasz százalékában adtuk meg. Az antagonista mérésekben az anyagok hatását a kontroll UK14,304 válaszhoz hasonlítottuk, és gátlás %-ként fejeztük ki.

### **3.5. A $\beta$ -arresztin-2 transzlokáció vizsgálata enzim-fragmens komplementációval**

A kísérleteket az enzim-fragmens komplementáción alapuló PathHunter<sup>TM</sup> eXpress ADRA2C  $\beta$ -arrestin GPCR Assay kit segítségével végeztük. A fagyasztásból felvett,  $\alpha_{2C}$ -AR-t stabilan és konstitutívan kifejező CHO-K1 alapú sejteket 96 lyukú, fehér falú szövettenyésztő lemezekre ültettük ki. A sejteket a vizsgálandó anyagokkal és kontroll oldatokkal kezeltük, majd 90 perces inkubáció után a holoenzim aktivitását PathHunter<sup>TM</sup> detekciós reagens hozzáadásával 60 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően mértük. A kemilumineszcenciát (RLU) Synergy4 multimode plate olvasóval rögzítettük. Az

agonisták  $E_{\max}$  válaszát az ugyanazon a lemezen meghatározott maximális UK14,304 válasz százalékában adtuk meg. Az antagonisták méréseiben az anyagok hatását a kontroll UK14,304 válaszhoz hasonlítottuk, és gátlás %-ként fejeztük ki.

### **3.6. Az $\alpha_2C$ -AR internalizáció vizsgálata enzim-fragmens komplementációval**

Az enzim-fragmens komplementáción alapuló PathHunter<sup>TM</sup> ADRA2C teljes GPCR internalizáció módszerrel történő mérésekhez 96-lyukú sejttenyésztő lemezre ültetett  $\alpha_2C$ -AR-t expresszáló U2OS sejteket használtunk. A sejteket a vizsgálni kívánt anyagokkal és kontroll oldatokkal kezeltük, majd 180 perces inkubáció után a holoenzim aktivitását PathHunter<sup>TM</sup> detekciós reagens hozzáadásával 60 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően mértük. A kemilumineszcenciát (RLU) a Synergy4 multimode plate olvasóval rögzítettük. Az agonisták  $E_{\max}$  válaszát az ugyanazon a lemezen meghatározott maximális UK14,304 válasz százalékában adtuk meg. Az antagonisták méréseiben az anyagok hatását a kontroll UK14,304 válaszhoz hasonlítottuk, és gátlás %-ként fejeztük ki. A receptor-internalizáció kinetikai eltéréseinek összehasonlításához Tukey-féle post hoc próbával kombinált varianciaanalízist (ANOVA) használtunk, és a  $p < 0,05$  valószínűségi értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

### **3.7 Az $\alpha_2C$ -AR agonisták funkcionális szelektivitásának elemzése**

Az agonisták funkcionális szelektivitásának kvantifikálásához az ún. relatív aktivitás (RA) módszert használtuk. Az RA értéket az  $E_{\max}$  és  $EC_{50}$  értékek hányadosaként minden agonista esetében kiszámoltuk. A vizsgált agonisták  $\log(RA)$  értékeit az endogén ligand, a noradrenalin (NA)  $\log(RA)$  értékeivel normalizáltuk ( $\log(RA_n) = \Delta \log(RA)$ ). Minden vizsgált jelpálya  $\Delta \log(RA)$  értékének meghatározása lehetővé tette az útvonalak közti összehasonlítást,  $\Delta \Delta \log(RA) = \Delta \log(RA)[jelpálya1] - \Delta \log(RA)[jelpálya2]$  értékek formájában. A funkcionális szelektivitás mértékét az ún. bias faktorról fejeztük ki, amelyet számszerűen a  $10^{\Delta \Delta \log(RA)}$  érték jellemez. A statisztikai szignifikancia ( $p < 0,05$ ) eldöntésére Student-féle párosítatlan t-próbát alkalmaztunk.

## 4. Eredmények és következtetések

### 4.1 $\alpha_2$ C-AR farmakológiai vizsgálata, a G-fehérje-függő és G-fehérje-független szignalizációs útvonalak jellemzése

- A gyógyszerkutatás jelenlegi fejlődési irányait szem előtt tartva, munkánk során az  $\alpha_2$ C-AR aktivációját kísérő különböző jelátviteli rendszerek farmakológiai vizsgálatához olyan in vitro módszereket dolgoztunk ki és alkalmaztunk, amelyek segítségével jellemeztük az  $\alpha_2$ C-AR ligandkötő képességét, valamint a különböző ligandokkal történő aktiváció során a receptor által létrehozott cAMP és  $[Ca^{2+}]_i$  válaszokat, a  $\beta$ -arresztin-2 transzlokációját, és a receptor internalizációját.
- A beállított módszerek alkalmasnak bizonyultak szerkezetileg különböző agonisták: két feniletilamin (NA és fenilefrin), egy guanidin (guanabenz), egy oxazolin (B-HT 920), 4 imidazolin (UK14,304, oximetazolin, klonidin, moxonidin), valamint antagonisták (MK912 és yohimbin) farmakológiai jellemzésére. A koncentráció-hatás görbék alapján minden funkcionális tesztben meghatároztuk a maximális válasz 50%-át létrehozó agonista koncentrációk ( $EC_{50}$ ) által jellemezhető hatékonysági, illetve az agonisták maximális hatáskiváltó képessége ( $E_{max}$ ) által jellemezhető hatásereőségi sorrendeket. A receptorkötési, valamint a cAMP és  $[Ca^{2+}]_i$  tesztekben nyert eredményeink jó egyezést mutatattak más munkacsoportok irodalomban közölt eredményeivel. Mivel az  $\alpha_2$ C-AR agonista indukálta  $\beta$ -arresztin kötésének és a receptor internalizációjának hatékonysági adatait elsőként publikáltuk, így elérhető irodalmi adatok hiányában eredményeinket csak más funkcionális tesztek eredményeivel tudtuk összehasonlítani. Az így nyert adatok szintén jól összevethetők voltak más módszerekkel nyert, irodalomban közölt adatokkal.
- Noha az  $\alpha_2$ C-AR elsődlegesen  $G\alpha_i$  kapcsolt, a receptort és a kiméra  $G\alpha_{q15}$  fehérjét stabilan koexpresszáló sejtvonal (H7) létrehozásával megállapítottuk, hogy az  $\alpha_2$ C-AR kiméra G-fehérjék révén kalcium szignalizáció irányába terelhető.
- Megmutattuk, hogy a  $G\alpha_i$  szignalizáció  $G\alpha_q$  irányba terelése nem befolyásolja a receptor farmakológia tulajdonságait, így ezáltal megerősítettük, hogy a létrehozott H7 sejtvonal és a  $[Ca^{2+}]_i$  változásait detektáló fluorometriás módszer jól alkalmazható a hatóanyag-kutatásban.

### 4.2 $\alpha_2$ C-AR agonisták funkcionális szelektivitásának elemzése

- Az  $\alpha_2$ C-AR stimulációja következtében párhuzamosan aktiválódó jelátviteli utak funkcionális válaszainak összehasonlításával megmutattuk, hogy egyetlen vizsgált

agonista sem volt teljes mértékben egy adott szignalizációs útvonalra szelektív. Ugyanakkor egyes ligandok különböző mértékben aktiválták az  $\alpha_{2C}$ -AR G-fehérje-függő és G-fehérje-független szignalizációs útvonalait, azaz bizonyos fokú útvonal szelektivitással rendelkeztek.

- Egy analitikai módszer, az RA skála alkalmazásával kvantifikáltuk is ezen ligandok funkcionális szelektivitásának mértékét, és ezáltal objektív módon igazoltuk néhány agonista jelátvitel-szelektív hatását. A bias faktorok meghatározásával azt is megállapítottuk, hogy a vizsgált  $\alpha_{2C}$ -AR ligandok kismértékű szerkezeti különbségei is okozhatnak útvonal-specifikus hatásokat.
- A receptor internalizációjának kinetikai eltéréseit vizsgálva megmutattuk, hogy az imidazolin származékok szignifikánsan gyorsabb internalizációs kinetikával jellemezhetők, mint az endogén agonista. Szintén érdekes megfigyelés volt, hogy a gyors internalizációs kinetikával jellemzett agonisták  $\beta$ -arresztin útvonal szelektivitása is kifejezettebb volt az endogén ligandhoz képest.

#### **4.3. A létrehozott rekombináns sejtvonal alkalmazása a hatóanyag-kutatásban**

- Az  $\alpha_{2C}$ -AR receptoron altípus-szelektivitást mutató új vegyületek azonosításához a létrehozott H7 sejtvonalon az alkalmazott funkcionális tesztek közül a leginkább költséghatékony  $[Ca^{2+}]_i$  módszert oly módon optimalizáltuk, hogy nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok során is releváns információt szolgáltasson a potenciálisan új szerkezetű agonisták funkcionális aktivitásáról.
- Egy nagy diverzitású, fragmens alapú vegyületkönyvtár szűrésével hatékony fragmens találatokat sikerült azonosítanunk. A találatok, illetve a kémiai környezetük feltérképezése során kiválasztott szerkezeti analógjaik vizsgálatával megállapítottuk, hogy kis szerkezeti különbségek drasztikus módon befolyásolják az  $\alpha_{2C}$ -AR receptorokon ható ligandok funkcionális aktivitását. Így eredményeink rávilágítottak az egyes struktúrköröket jellemző agonista és antagonisták aktivitású  $\alpha_{2C}$ -AR ligandok magas szerkezeti hasonlóságára.

Összességében, a különböző funkcionális tesztek által szolgáltatott eredményeink új felismerésekkel gazdagították a  $\alpha_{2C}$ -AR működéséről alkotott képünket, amelyek a közeljövőben hozzájárulhatnak az útvonal-specifikus ligandok, és ezáltal a kedvezőbb terápiás profillal rendelkező gyógyszerek kifejlesztéséhez.



## 5. Publikációs lista

### 5.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Kurko D.**, Bekes Z., Gere A., Baki A., Boros A., Kolok S., Bugovics G., Nagy J., Szombathelyi Z., Ignacz-Szendrei G., 2009. Comparative pharmacology of adrenergic  $\alpha_{2C}$  receptors coupled to  $Ca^{2+}$  signaling through different G $\alpha$  proteins. *Neurochem. Int.* 55(7), 467-475.
- Kurko D.**, Kapui Z., Nagy J., Lendvai B., Kolok S., 2014. Analysis of functional selectivity through G protein-dependent and -independent signaling pathways at the adrenergic  $\alpha_{2C}$  receptor. *Brain Res. Bull.* 107, 89-101.
- Szöllősi E., Bobok A., Kiss L., Vass M., **Kurko D.**, Kolok S., Visegrády A., Keserű Gy.M., 2014. Cell-based and virtual fragment screening for adrenergic  $\alpha_{2C}$  receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.*, közlésre benyújtva.

### 5.2 Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó egyéb közlemények

- Kurkó D.**, Dezső P., Boros A., Kolok S., Fodor L., Nagy J., Szombathelyi Zs., 2005. Inducible expression and pharmacological characterization of recombinant rat NR1a/NR2A NMDA receptors. *Neurochem. Int.* 46, 369-379.
- Kurkó D.**, Boros A., Dezső P., Urbányi Z., Sárvári M., Nagy J., Szombathelyi Zs., Ignacz-Szendrei Gy., 2006. Flow cytometry-based method to analyze the change in Tau phosphorylation in a hGSK-3 $\beta$  and hTau over-expressing EcR-293 cell line. *Neurochem. Int.* 48, 374-382.
- Wágner G., Wéber C., Nyéki O., Nógrádi K., Bielik A., Molnár L., Bobok A., Horváth A., Kiss B., Kolok S., Nagy J., **Kurkó D.**, Gál K., Greiner I., Szombathelyi Zs., Keserű G.M., Domány G., 2010. Hit-to-lead optimization of disubstituted oxadiazoles and tetrazoles as mGluR5 NAMs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3737–3741.
- Galambo J., Wágner G., Nógrádi K., Bielik A., Molnár L., Bobok A., Horváth A., Kiss B., Kolok S., Nagy J., **Kurkó D.**, Bakk ML., Vastag M., Sággy K., Gyertyán I., Gál K., Greiner I., Szombathelyi Zs., Keserű GM., Domány G., 2010. Carbamoyloximes as novel non-competitive mGlu5 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 4371-4375.

Kiss JP., Szasz B.K., Fodor L., Mike A., Lenkey N., **Kurkó D.**, Nagy J., Vizi E.S., 2012. GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. *Neurochem. Int.* 60(2), 170-176.

### 5.3 Referált folyóiratokban megjelent poszterkivonatok

**Kurkó D.**, Boros, A., Urbányi Z., Dezső P., Nagy J., Ignácz-Szendrei Gy., 2005. Generation and characterization of recombinant hGSK-3 $\beta$  and hTau over-expressing EcR-293 cells. *The Febs Journal* 272(1), M3,017P.

Boros A., **Kurkó D.**, Urbányi Z., Sárvári M., Dezső P., Nagy J., Ignácz-Szendrei Gy., 2005. Tau hyperphosphorylation in a double-transfected hGSK 3 $\beta$ /hTau-ECR cell line. Flow cytometry-based immunocytochemical study. *The Febs Journal* 272(1), M3, 008P.

**Kurkó D.**, Gere A., Baki A., Boros A., Nagy J., Ignácz-Szendrei Gy., 2006. Establishment of a functional assay for screening adrenergic  $\alpha_{2C}$  receptor agonists. *Clinical Neuroscience*, 59, suppl. 1.

Nagy J., **Kurkó D.**, Baki A., Kolok S., Bekes Zs., Ignácz-Szendrei Gy., 2006. Functional screening of compounds acting at G $\alpha_i$ -Coupled Receptors. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine Issue 6, vol. 3*, 473-477.

Ignácz-Szendrei Gy., Makó É., Gere A., **Kurkó D.**, Baki A., Polgár T., Kordás K., KisVarga Á., Galgóczy K., Elekes O., 2006. Partial agonist compound for the treatment of adrenergic  $\alpha_{2C}$  receptor mediated analgesia. *Int. J. Psychophysiol.* 61/3, 340.

**Kurko D.**, Kapui Z., Nagy J., Lendvai B., Kolok S., 2015. Biased or partial agonism? Quantifying functional selectivity at the adrenergic  $\alpha_{2C}$  receptor. *WASET Journal (ICCMB 2015: International Conference on Cellular and Molecular Biology)*, közlésre elfogadva.